

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE

“AMEDEO AVOGADRO”



DOTTORATO DI RICERCA

IN

MEDICINA MOLECOLARE

XXII° CICLO

**CARATTERIZZAZIONE CLINICA E MOLECOLARE DEGLI
AUTO-ANTICORPI ANTI-CYP2E1 ASSOCIATI CON L'EPATITE
CRONICA C**

CANDIDATO

SALVATORE SUTTI

TUTOR

PROF. EMANUELE ALBANO

ANNO ACCADEMICO 2008/2009

INDICE

INTRODUZIONE.....	3
SCOPO.....	5
MATERIALI E METODI.....	6
RISULTATI.....	12
DISCUSSIONE.....	23
BIBLIOGRAFIA.....	26
ATTIVITA' FORMATIVA ANNO ACCADEMICO 2008-2009.....	29
PUBBLICAZIONI.....	31

INTRODUZIONE

L'infezione cronica da virus dell'epatite C è spesso associata a numerose manifestazioni extraepatiche di autoimmunità, quali scialoadenite linfocitica, lichen piano, poliarterite nodosa, glomerulonefrite, tiroidite e crioglobulinemia mista (1).

L'esistenza di un'alterata omeostasi del sistema immune in pazienti con epatite C è ulteriormente suggerita dall'elevata prevalenza di anticorpi non-organo specifici. In particolare, anticorpi anti-muscolo liscio e anti-nucleo sono presenti rispettivamente nel 14-66% e nel 6-41% (2). La rilevanza clinica di questi anticorpi, come pure i meccanismi responsabili della perdita della tolleranza al self, sono scarsamente caratterizzati.

In aggiunta agli autoanticorpi non-organo specifici descritti sopra, i pazienti con infezione da HCV possono sviluppare autoanticorpi anti-microsomi epatici e renali di tipo I (LKM-1) diretti verso il citocromo P450 2D6 (CYP2D6). Sebbene, questi autoanticorpi siano osservati solo nello 0-11% dei pazienti (4), la sieropositività per LKM-1 riveste un ruolo particolarmente importante. Infatti, i pazienti con infezione cronica da HCV con alti titoli di autoanticorpi anti-LKM-1 tendono a presentare sia un danno epatico più severo, sia più gravi effetti collaterali in risposta al trattamento con interferone (5-6). La possibilità che gli autoanticorpi anti-LKM-1 possano contribuire al danno epatico indotto da HCV è suggerita da numerose evidenze sperimentali. In particolare, Muratori e colleghi hanno dimostrato che gli anti-LKM-1 presenti in pazienti con infezione da HCV riconoscono il CYP2D6 espresso sul versante esterno della membrana plasmatica epatocitaria (7). Inoltre studi strutturali hanno indicato che i principali epitopi del CYP2D6 riconosciuti dagli anti-LKM-1 sono esposti sulla superficie del citocromo (8).

Gli anticorpi anti-LKM-1 presenti nel siero di pazienti con epatite da virus C riconoscono epitopi lineari e conformazionali (1). L'analisi di sequenza di questi epitopi ha rivelato omologie strutturali con alcune proteine dell'HCV (9-10). Recentemente, Marceau e collaboratori hanno dimostrato che i sieri di pazienti affetti da epatite cronica C, positivi per anticorpi anti-LKM-1, riconoscono epitopi conformazionali del CYP2D6, compresi tra gli amminoacidi 254 e 288, che cross-reagiscono con le proteine NS3 e NS5 del virus HCV (11). Questi dati sembrano suggerire che il mimetismo molecolare tra il virus HCV e le proteine degli epatociti possa essere responsabile della perdita della tolleranza al self.

Oltre al CYP2D6 altri membri della superfamiglia del citocromo P450 (CYP) rappresentano dei bersagli antigenici per gli autoanticorpi associati all'epatite cronica da HCV. In particolare, Dalekos e colleghi hanno riportato la presenza di autoanticorpi anti-CYP2A6 nell'8% e nel 2% di pazienti infetti da HCV rispettivamente anti-LKM-1 positivi e negativi (12). Inoltre, una minoranza di pazienti con infezione cronica da HCV presenta titoli di autoanticorpi diretti verso CYP3A4 (13).

Studi condotti nel nostro laboratorio hanno mostrato che circa il 40% dei pazienti con epatite cronica C presenta autoanticorpi diretti verso l'isoforma alcol-inducibile 2E1 del citocromo P450 (CYP2E1) (14). Questi autoanticorpi non cross-reagiscono con CYP2D6 e non sono associati a età, genotipo virale e consumo alcolico. Sebbene, inoltre, gli autoanticorpi anti-CYP2E1 riconoscano l'isoforma espressa sul versante esterno della membrana cellulare epatocitaria (14), l'analisi statistica non ha evidenziato associazioni significative fra la presenza dell'autoreattività anti-CYP2E1 ed aumentati livelli di transaminasi o gravità del danno all'esame istologico. Tuttavia, uno studio preliminare di caratterizzazione antigenica ha rivelato che gli autoanticorpi anti-CYP2E1 associati all'epatite cronica C presentano un'ampia eterogeneità di bersagli antigenici. Infatti, alcuni sieri mostrano una preferenziale reattività verso epitopi lineari del citocromo, mentre altri riconoscono esclusivamente epitopi conformazionali.

La presenza di autoanticorpi anti-CYP2E1 è stata documentata anche in pazienti con epatite indotta dal gas anestetico alotano (15) e in un sottogruppo di pazienti con patologia epatica alcolica in stadio avanzato (16). Studi condotti in queste popolazioni hanno evidenziato che questi autoanticorpi riconoscono specificatamente epitopi conformazionali presenti sulla superficie molecolare di CYP2E1 (17). Recentemente, nel nostro laboratorio è stato inoltre messo in evidenza come in pazienti HCV, sottoposti a trapianto epatico, la presenza di autoreattività anti-CYP2E1 come pure la persistenza degli autoanticorpi, prima e dopo il trapianto, siano fattori di rischio indipendenti per una estesa necro-infiammazione nella recidiva di epatite C post-trapianto (3). Inoltre, i pazienti con persistenza delle IgG anti-CYP2E1, post-trapianto, hanno una probabilità tre volte superiore di sviluppare una grave epatite durante il periodo di follow-up (3).

Queste osservazioni ci hanno spinto ad investigare, in un'ampia popolazione di pazienti, la specificità antigenica degli autoanticorpi associati all'epatite cronica C e a valutarne il possibile significato sulla progressione del danno epatico indotto dal virus. Inoltre, parte dell'attività scientifica di questo terzo anno di Dottorato è stata dedicata allo studio dei meccanismi molecolari potenzialmente responsabili della perdita della tolleranza al self degli autoanticorpi anti-CYP2E1.

SCOPO

- Caratterizzazione della specificità antigenica degli auto-anticorpi anti-CYP2E1: identificazione di epitopi conformazionali maggiori.
- Ampliamento dell'analisi dei residui aminoacidici potenzialmente coinvolti nella interazione antigene-anticorpo.
- Valutazione dell'accessibilità per il riconoscimento degli epitopi conformazionali, sinora identificati, da parte degli anticorpi anti-CYP2E1.
- Studio del ruolo dell'auto-reattività anti-CYP2E1 nella patogenesi e nella progressione del danno epatico.
- Studio dei meccanismi potenzialmente responsabili della perdita della tolleranza al self verso CYP2E1 nei pazienti con infezione cronica C.

MATERIALI E METODI

Preparazione di CYP2E1 ricombinante umano wild-type e isoforme mutate mediante espressione in E. Coli

Il plasmide di espressione pCWori+ (20) contenente l'inserto codificante per il CYP2E1 wild-type è stato gentilmente donato dal Prof. Magnus Ingelman-Sundberg della Divisione di Tossicologia Molecolare, Istituto di Medicina Ambientale, Istituto Karolinska, Stoccolma, Svezia. In particolare alla sequenza del CYP2E1 sono stati aggiunti 6 residui di istidina all'estremità C-terminale e, per ottimizzare l'espressione, sono stati eliminati i nucleotidi codificanti i primi 18 aminoacidi (21).

Per l'espressione delle isoforme mutate di CYP2E1 (vedi Tabella 1) sono stati utilizzati plasmidi disponibili presso il nostro laboratorio e preparati come descritto precedentemente (17).

Numero	Mutazione
1	Lys324 → Ala324
2	Arg331 → Ala331
3	Lys342 → Ala342
4	Arg344 → Ala344
5	Glu346 → Ala346
6	Lys420 → Ala420
7	Phe421 → Ala421
8	Lys243, Glu244, Glu248, Lys251 ↓ Ala243, Ala244, Ala248, Ala251

Tabella 1: Elenco delle isoforme mutate di CYP2E1 espresse in E. Coli ed utilizzate per gli esperimenti di immunoprecipitazione.

Cellule Supercompetenti XL1 Blue di E. Coli (70 µl) sono state trasformate per shock termico con 1 µl delle soluzioni di CYP2E1 plasmidico wild-type o mutato e successivamente selezionate con piastre LB agar contenenti ampicillina. Singole colonie sono state ulteriormente cresciute per 16 h a 37°C e 10 h a 4°C in terreno LB più ampicillina. 2 ml di queste colture sono stati aggiunti ad una soluzione contenente 178 ml di TB-medium (Bacto-Tryptone 1,2% (w/v), estratto di lievito 2,4% (w/v), glicerolo 0,4% (v/v), 20 ml di buffer potassio-fosfato 0,17 M (0,17 M di-idrogenofosfato di potassio, 0,72 M idrogenofosfato di di-potassio), 200 µl di ampicillina (50mg/ml), 200 µl di tiamina (1 M), 200 µl di acido δ-amino levulinico o d-ALA (0,5 M) e 200 µl di FeCl₃ (25 mM). La miscela di reazione è stata quindi incubata a 37°C in agitazione continua. La crescita batterica è stata monitorata spettrofotometricamente. Al raggiungimento di una densità ottica (o.d.) di 0,7 unità, alla miscela sono stati aggiunti 200 µl di IPTG (1 M) e 20 µl di imidazolo (0,5 M) a cui è seguita una successiva incubazione a 30°C in agitazione continua per 24 h.

Valutazione dell'autoreattività anti-CYP2E1 tramite esperimenti di immunoprecipitazione

Per gli esperimenti di immunoprecipitazione 10 pmol di CYP2E1 wild-type o mutato sono stati disciolti in RIPA buffer (50 mmol/l di Tris/HCl, 1% di NP-40, 0,25% di sodio deossicolato, 150 mmol/l di NaCl e 1 mmol/l di EDTA a pH 7,4) a cui sono stati aggiunti 5 µl di siero umano (volume finale 100 µl con diluizione finale siero 1:20) ed incubati per 16 ore a 4°C su rotore orbitale. Dopo incubazione per 2 ore a 4°C con 50 µl di proteina A-sepharosio CL4B (1:1 sospensione in PBS) (Amersham Biosciences, Amersham, UK), gli immunocomplessi legati sono stati recuperati tramite centrifugazione, lavati tre volte con 1 ml di PBS e solubilizzati in 40 µl di SDS buffer pH 6,8 e analizzati e sottoposti a western blot, come descritto precedentemente, utilizzando come anticorpo rivelatore della proteina CYP2E1 un siero anti-istidina di topo (diluizione 1:2000), diretto verso la coda di istidina (His-6) della proteina. L'intensità delle bande ottenute con le differenti forme mutate di CYP2E1 è stata misurata tramite videodensitometria, utilizzando il software Quantity One versione 4.5.0 (Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA), ed espressa come percentuale di intensità residua rispetto al CYP2E1 wild-type.

Induzione dell'espressione del citocromo P450 isoforma 2E1

Per indurre l'espressione del CYP2E1 è stato somministrato, a ratti maschi di ceppo Wistar, un bolo intragastrico (5ml/kg/die) di acetone 30% (v/v) in soluzione fisiologica, per due giorni consecutivi. Il terzo giorno, i ratti sono stati anestetizzati e sacrificati per l'isolamento degli epatociti.

Isolamento degli epatociti

Gli epatociti primari sono stati isolati da fegato di ratti maschi di ceppo Wistar con peso corporeo di 250-300gr (Harlan Italy S.Pietro al Natisone (UD), Italia), utilizzando la tecnica della perfusione "in situ" con collagenasi. L'uso e cura degli animali sono stati approvati dal Ministro Italiano della Salute e dalla Commissione Università per la Cura degli animali rispettando le direttive del Consiglio nazionale della Ricerca Italiana.

I ratti sono stati anestetizzati iniettando intraperitonealmente una soluzione di pentotal sodico (50mg/Kg di peso corporeo) alla quale è stata aggiunta eparina (37mg/Kg di peso corporeo). Agli animali è stata aperta la cavità addominale ed è stata incanalata la vena porta. Il fegato è stato perfuso per 10 minuti con il tampone salino T1 (NaCl 143mM, KCl 7mM ed Hepes 10 mM a pH 7.4) mantenuto a 37°C, con un flusso costante di 7.5 unità di pressione grazie all'utilizzo di una pompa peristaltica LKB Bromma 2115.

Dopo questa prima fase di lavaggio del fegato, l'organo è stato perfuso con 200ml di tampone salino T2 (NaCl 100mM, KCl 40mM, CaCl₂ 5 mM, la collagenasi di tipo I 0.05%, tampone Hepes-NaOH 500mM, pH 7.4), anch'esso mantenuto a 37°C, con un flusso costante di 4 unità di pressione

Il fegato così digerito è stato rimosso dall'animale e risospeso in 50ml di terreno DMEM5671 (Sigma) e gli epatociti sono stati purificati attraverso tre centrifugate da 5 minuti l'una a 500 rpm, seguite da un'ultima centrifugata 1050 rpm su gradiente di Percoll.

Dopo questo procedimento è stato effettuato il conteggio delle cellule utilizzando una camera Burkner ed è stata valutata la vitalità cellulare attraverso la conta al microscopio degli epatociti sfruttando il test di esclusione del Blu Tripiano.

Dopo il conteggio la sospensione cellulare viene portata ad una concentrazione di 1×10^6 cellule/ml.

Valutazione della capacità di sieri HCV di riconoscere, in citofluorimetria a flusso, il CYP2E1 espresso sulla membrana degli epatociti.

Gli epatociti primari, 1×10^6 cellule per punto sperimentale, sono stati risospesi in 500 μ l di PBS-BSA 0,1% freddo, contenente, rispettivamente, un siero di un paziente HCV (1:50) o un anticorpo policlonale di coniglio anti-CYP2E1 (1:250), mentre per il controllo negativo è stato aggiunto solo del PBS 1X. Quindi, i campioni sono stati incubati sul rotore orbitale per 1h a 4°C. Successivamente, gli epatociti sono stati lavati con 500 μ l di PBS-BSA 0,1% e risospesi nuovamente in PBS-BSA 0,1% contenente, rispettivamente, l'anticorpo secondario (1:100) anti-human IgG o anti-rabbit IgG coniugati con il FITC (Fluoresceina isotiocianato). Incubati 30 minuti su rotore orbitale a 4°C. A questo punto dopo aver effettuato un lavaggio con PBS-BSA 0,1%, i campioni sono stati risospesi, in 700 μ l di PBS 1X, ed analizzati al FACScan Becton Dickinson (San Jose, CA, USA).

I dati ottenuti da ciascun esperimento sono stati analizzati usando il programma WINMDI.

Analisi di potenziali cross-reazioni tra CYP2E1 e proteine di HCV

Le sequenze aminoacidiche, in formato FASTA, del peptide 324-346 del citocromo umano P450 isoforma 2E1 (P05181) e della poliproteina di differenti genotipi di HCV, contenute nel database Swiss-Prot/TrEMBL accessibile al sito web ExPasy (<http://www.expasy.org>), sono state allineate utilizzando il programma di allineamento multiplo di sequenze proteiche ClustalW, disponibile al sito web dell'Istituto Europeo di Bioinformatica EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>).

La rappresentazione grafica degli allineamenti è stata ottenuta utilizzando il software BOXSHADE versione 3.21, disponibile al sito web EMBnet (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html).

Dopo aver individuato una buona omologia di sequenza tra i peptidi 324-334 e 335-346 di CYP2E1 e, rispettivamente, i peptidi 438-449 e 456-465 della proteina virale NS5B, abbiamo valutato la presenza di un'eventuale omologia a livello strutturale. A tal fine, avvalendoci del modello molecolare del CYP2E1, e tramite l'ausilio del software RasTop, abbiamo isolato la sequenza

aminoacidica di interesse e generato un modello tridimensionale della regione contenente il peptide 324-346. Similmente abbiamo utilizzato il modello tridimensionale della proteina virale NS5B genotipo 1b (codice 1C2P), l'unica al momento disponibile nella banca dati RCSB Protein Data Bank (PDB) accessibile dal sito internet <http://www.rcsb.org>, per generare un modello tridimensionale del peptide virale 421-480aa. Infine, utilizzando il software DeepView-SwissPdbViewer, abbiamo confrontato i due modelli così realizzati, per valutare l'esistenza di motivi strutturali omologhi. L'analisi al computer ha dimostrato che i due modelli tridimensionali presentavano una buona sovrapposizione (RMSE = 0,062 nm).

Clonaggio dei peptidi 438-449 e 456-465 della RNA-polimerasi RNA-dipendente (NS5B) di HCV omologa al CYP2E1 umano

Per generare le sequenze nucleotidiche di NS5B omologhe al CYP2E1 umano è stata realizzata una reazione di PCR in assenza di DNA come stampo. La reazione è stata eseguita in un volume finale di 20 µl, utilizzando per la miscela di reazione: primer forward e reverse (Tabella 2) tra loro parzialmente sovrapponibili (18 bp) 0.5 µM, T_m 56°C (Biomers), MgCl₂ 1.5 mM (Fermentas), dNTPs 0.5 mM (Fermentas), Dream Taq polymerase 0.5 U/µl (Fermentas).

In particolare, il primer forward comprende la sequenza codificante per un linker glicina-serina, mentre entrambi gli oligonucleotidi recano un sito di riconoscimento per gli enzimi di restrizione utilizzati successivamente per consentire l'inserimento del prodotto di amplificazione in un vettore di espressione.

Gli amplificati ottenuti, dopo aggiunta del colorante "Orange G" DNA Loading Buffer (6X), sono stati analizzati attraverso elettroforesi orizzontale su gel d'agarosio 1.5% (45 minuti a 100 V) in TAE (40 mM Tris, 40 mM acido acetico, 1 mM EDTA pH 8), e rivelati con GelRed (10000X) (Biotium, Hayward, CA). Per l'acquisizione delle immagini della corsa elettroforetica è stato utilizzato il sistema GelDoc Imaging XR System (Bio-Rad Laboratories Inc. Hercules, CA).

I campioni sono stati successivamente purificati dal gel di agarosio avvalendosi del kit NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel). Un'aliquota di ciascun campione è stata sottoposta ad un'ulteriore corsa elettroforetica su gel di agarosio 1,5% (45 minuti 100 V) per controllare la resa dello step di purificazione, e quantificata al transilluminatore (BioRad UVGen), mediante confronto con un marker di DNA (GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus).

NS5B1b₄₃₈₋₄₄₉ forward	GCTAGCGCGCATGGTGGAGGTGGCTCCCAACTTGAGAAAGCCCTAGATTGTCAG
NS5B1b₄₃₈₋₄₄₉ reverse	CGATGCTAGCCCCGTAGATCTGACAATCTAGGGCTTTCTC
NS5B1b₄₅₆₋₄₆₅ forward	GCTAGCGCGCATGGTGGAGGTGGCTCCCCACTTGACCTACCT CAG
NS5B1b₄₅₆₋₄₆₅ reverse	CGATGCTAGCTCGTTCAATGATCTGAGGTAGGTCAAGTGG

Tabella 2: Elenco dei primers utilizzati nelle reazioni di amplificazione dei peptidi NS5B₄₃₈₋₄₄₉ e NS5B₄₅₆₋₄₆₅ di HCV genotipo 1b.

Il template è stato poi sottoposto a reazione di sequenza (BigDye terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystem) ed analizzato con sequenziatore automatico (ABI Prism 3100 Genetic Analyzer).

Successivamente, una versione modificata del vettore di espressione pGex4T-1, gentilmente fornita dal gruppo del Prof. Sblattero, e lo stesso inserto sono stati digeriti attraverso enzimi di restrizione BsshII e NheI e successivamente sottoposti a reazione di ligazione con DNA ligasi per l'inserimento del frammento di DNA nel vettore di clonaggio. Dopodiché, cellule competenti di *E.coli* (DH5 α) sono state trasformate, per shock termico, con i differenti plasmidi e selezionate su piastre LB agar contenenti ampicillina.

Espressione e purificazioni delle proteine di fusione GST-NS5B₄₂₂₋₄₈₀, GST-NS5B₄₃₈₋₄₄₉ e GST-NS5B₄₅₆₋₄₆₅

Le singole colonie sono state cresciute in terreno LB contenente ampicillina (50 μ g/ml) fino al raggiungimento di una densità ottica (o.d.) di 0,6 unità, a questo punto alla coltura è stato aggiunto IPTG alla concentrazione finale di 1 mM, ed è seguita una successiva incubazione a 30°C in agitazione continua per 5h. Le colture sono state trasferite in tubi da centrifuga e centrifugate per 15 minuti a 1250g. Dopo centrifugazione i pellet sono stati risospesi in PBS 1X, pH 7.4, contenente 1% di Triton-X-100, Lisozima (0,25 mg/ml), PMSF (1mM), EDTA (1mM) ed inibitori delle proteasi (25 μ l/ml; Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland), e lisati per sonicazione. Dopo 15 min di centrifugazione a 13000g, gli estratti batterici sono stati incubati su rotore orbitale per 1h a 4°C, con resina Glutathione-Agarosio (Sigma-Aldrich), ed i peptidi coniugati con il GST (GST-NS5B₄₂₂₋₄₈₀, GST-NS5B₄₃₈₋₄₄₉ e GST-NS5B₄₅₆₋₄₆₅) sono stati purificati tramite cromatografia di affinità usando come eluente glutathione ridotto 10mM in Tris-HCl 50mM, pH 9.5.

Valutazione della cross-reattività tra i peptidi virali NS5B₄₃₈₋₄₄₉ e NS5B₄₅₆₋₄₆₅ e gli autoanticorpi anti-CYP2E1, mediante ELISA e saggi di competizione.

Per valutare la cross-reattività in ELISA dei sieri dei pazienti CHC con i peptidi virali omologhi al CYP2E1 sono state utilizzate delle piastre di polistirene per ELISA (Nunc-Immuno Maxi-Sorp, Nunc, S/A, Roskilde, Denmark). Metà dei pozzetti sono stati ricoperti con 2µg dell'uno o dell'altro peptide, l'altra metà invece con la sola proteina carrier (GST), il tutto solubilizzato in buffer bicarbonato 0,1 M a pH 9,6 ed incubato overnight a 4°C.

Mentre, per gli esperimenti di competizione i sieri umani sono stati incubati overnight su rotore orbitale con 4µg/ml, rispettivamente, di GST-NS5B₄₃₈₋₄₄₉ e GST-NS5B₄₅₆₋₄₆₅ o del solo GST. Gli immunocomplessi sono stati separati per centrifugazione a 13000g per 8 min ed i surnatanti sono stati testati per la loro reattività verso il CYP2E1 in ELISA.

Analisi dei dati e statistica

Per l'analisi statistica dei dati è stato impiegato il software statistico SPSS versione 15.0 (SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA). Le differenze tra i gruppi sono state stimate con test non parametrico Mann-Whitney o Kruskal-Wallis e con test Chi-quadro o test esatto di Fisher. L'intervallo di confidenza è stato calcolato usando il software CIA versione 2.1.1 (T Bryant, University of Southampton, UK). L'effetto indipendente delle variabili significative all'analisi univariata e multivariata è stato calcolato usando l'analisi di regressione logistica. L'adattamento alla distribuzione normale è stato valutato con i test di Kolmogorov-Smirnov e di Shapiro-Wilk. In presenza di una consistente deviazione dall'ipotesi di normalità, questa è stata corretta, quando possibile, attraverso trasformazione logaritmica.

RISULTATI

Riassunto risultati dell'attività scientifica svolta durante il secondo anno di Dottorato.

Nel corso dei precedenti anni di Dottorato avevamo dimostrato che autoanticorpi anti-CYP2E1 a titoli superiori al 97° percentile della popolazione dei controlli (o.d._{490nm} 0.470) erano evidenziabili in 52 su 137 (38%) pazienti affetti da CHC.

Nonostante il 38% dei sieri mostrassero autoanticorpi anti-CYP2E1 in ELISA, 23/52 (44%) presentavano una riduzione pari al 90% o maggiore dell'autoreattività anti-CYP2E1 in condizioni denaturanti e riducenti (Western blotting). Tuttavia, tutti i 52 sieri conservavano la capacità di immunoprecipitare il CYP2E1 umano purificato in condizioni native. Questi risultati avevano suggerito che è possibile identificare e analizzare un sottogruppo di pazienti con infezione cronica C sulla base della loro capacità di riconoscere preferenzialmente epitopi conformazionali di CYP2E1. Questa differenza di specificità anticorpale non era associata con un particolare genotipo virale né con una differenza complessiva nella reattività verso il CYP2E1 (o.d._{490nm} 0.708±0.112 vs 0.626±0.245; p=0.37). Inoltre, i pazienti con autoanticorpi diretti verso epitopi conformazionali di CYP2E1 rispetto ai pazienti anti-CYP2E1 negativi o con autoanticorpi diretti verso gli epitopi lineari non presentavano sostanziali differenze relativamente alle caratteristiche cliniche o biochimiche.

Tuttavia, all'esame istologico, lo score di necroinfiammazione (grading) e fibrosi (staging) erano significativamente elevati nei pazienti con autoanticorpi anti-CYP2E1 diretti verso gli epitopi conformazionali. In aggiunta, il sottogruppo di pazienti con infezione cronica C e autoanticorpi diretti verso epitopi conformazionali di CYP2E1 presentava sia una maggior prevalenza (39% vs 13%, diff 26%, 95%IC 3-53%; p=0,037) che un aumentato rischio (O.R. 4,3; 95%IC 1,2-16,1) di necrosi della lamina limitante epatocitaria (G1≥2), un importante marker morfologico di progressione verso la cirrosi.

All'analisi univariata l'età (p=0,035) e la presenza di autoanticorpi diretti verso epitopi conformazionali di CYP2E1 (p=0,023), ma non la positività anti-CYP2E1 (p=0,741) erano significativamente associati con la necroinfiammazione di grado moderato; tuttavia, l'analisi multivariata aveva evidenziato che la presenza di anticorpi verso epitopi conformazionali rimaneva l'unico predittore indipendente di necroinfiammazione.

Mentre, l'analisi dei fattori associati allo sviluppo di fibrosi di grado moderato/severo aveva evidenziato che l'età (p<0,001), la steatosi (p=0,038), la necroinfiammazione (p<0,001) e la presenza di autoanticorpi diretti verso epitopi conformazionali di CYP2E1 (p=0,013) erano significativamente associati con la fibrosi di grado moderato/severo; tuttavia, l'analisi multivariata

aveva messo in luce che solo il grado di necroinfiammazione e l'età erano predittori indipendenti di fibrosi moderata/severa.

I nostri risultati suggerivano quindi che la presenza di autoanticorpi verso specifici epitopi conformazionali può rappresentare un fattore di rischio per la progressione ad un danno epatico più severo nei pazienti con infezione cronica C che sviluppano autoreattività anti-CYP2E1.

Poiché, dai nostri risultati emergeva che solo l'autoreattività verso epitopi conformazionali risultava essere associata, nei pazienti HCV, ad un danno epatico maggiore; abbiamo deciso di intraprendere la caratterizzazione degli epitopi conformazionali situati sulla superficie molecolare del citocromo. I dati raccolti, nell'anno precedente, sono stati ulteriormente estesi con esperimenti condotti in questo terzo anno di Dottorato.

Caratterizzazione della specificità antigenica degli auto-anticorpi anti-CYP2E1: identificazione di epitopi maggiori

Nel complesso, abbiamo valutato l'effetto di singole sostituzioni aminoacidiche sulla capacità antigenica dell'intera molecola di CYP2E1, analizzando in immunoprecipitazione 20 sieri con anticorpi anti-CYP2E1 conformazionali e paragonando la reattività verso CYP2E1 wild-type e verso le isoforme mutate Lys324, Arg331, Lys342, Arg 344, Glu346, Lys420, Phe421. È stata inoltre utilizzata una forma mutata di CYP2E1 contenente 4 sostituzioni aminoacidiche ad alanina dei residui Lys243, Glu244, Glu248 e Lys251 localizzati a livello dell'elica G. Questi 4 aminoacidi sono stati selezionati perché situati sulla superficie molecolare di CYP2E1 in un'area altamente antigenica, e la cui sostituzione non modifica il corretto folding dell'intero citocromo. La Figura 1 mostra che uguali quantità di CYP spettrale wild-type o mutato sono immunoprecipitate dai differenti sieri in misura maggiore o minore, verosimilmente a causa dell'affinità variabile indotta dalla singola sostituzione aminoacidica. In particolare, considerando variazioni nella reattività anticorpale dell'ordine del 50%, abbiamo osservato che le sostituzioni di Lys324 e Arg331, da sole o in combinazioni, erano le più efficaci, modificando la reattività verso il CYP2E1 di 17 dei 20 sieri testati (85%). La reattività dei restanti 3 sieri era invece modificata dalla mutagenesi a carico dei residui Lys342 e Glu346 (Figura 1). Queste stesse mutazioni, insieme alla sostituzione a carico di Arg344, erano inoltre efficaci in altri 14 sieri. Le sostituzioni a carico di Lys420 e Phe421 erano più soggette a variazioni, coinvolgendo solo 6 sieri (30%) (Figura 1). Al contrario, è interessante notare che tutti i sieri immunoprecipitavano in ugual misura l'isoforma mutata di CYP2E1 recante le 4 sostituzioni aminoacidiche nell'elica G (Figura 1). Inoltre, nessuna delle sostituzioni aminoacidiche ha alterato il riconoscimento di CYP2E1 da parte dei sieri con anticorpi diretti preferenzialmente

verso gli epitopi lineari (Figura 1). La simulazione al computer, utilizzando il modello molecolare di CYP2E1, ha rivelato che i residui mutati che influenzavano il legame anticorpale, sebbene distanti nella sequenza aminoacidica, vengono a trovarsi in stretta prossimità dopo il ripiegamento della proteina, identificando un possibile epitopo conformazionale in un'area larga circa 1.9-2.0 nm in un sito antigenico formato dalla giustapposizione delle eliche J, J' e K'' (Figura 2).

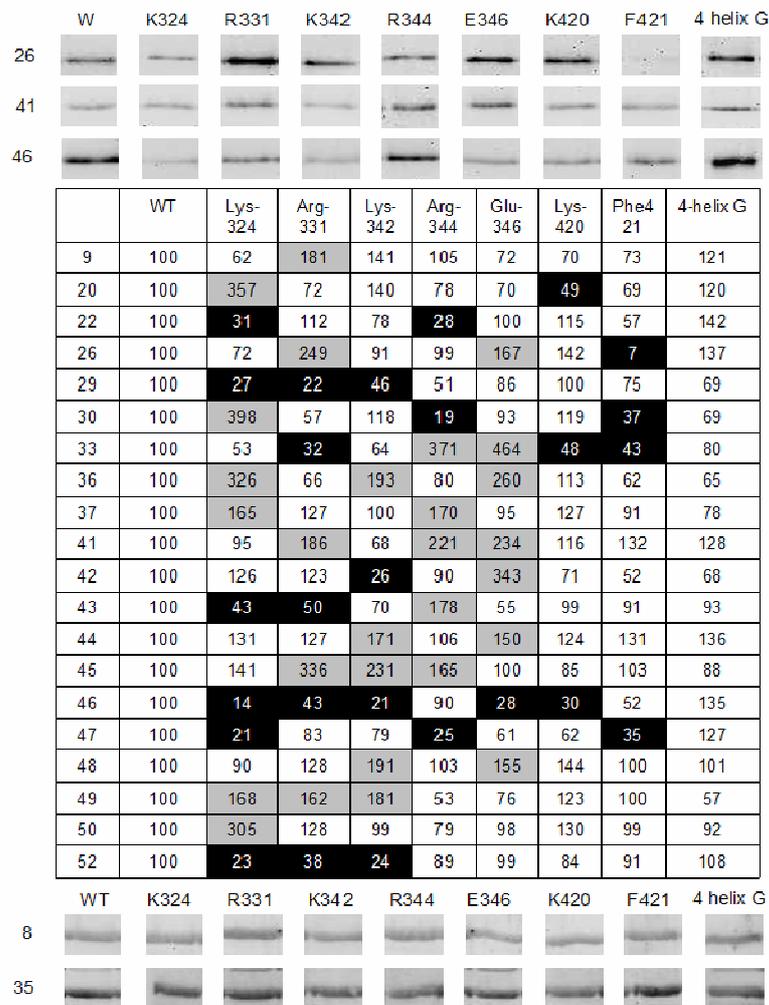


Figura 1: Effetto di singole sostituzioni aminoacidiche sul riconoscimento di CYP2E1 ricombinante umano da parte di 20 sieri di pazienti con CHC e anticorpi anti-CYP2E1 diretti verso epitopi conformazionali. Le intensità delle bande sono state misurate tramite videodensitometria ed i risultati sono stati espressi come percentuale di reattività residua delle forme mutate rispetto al CYP2E1 wild-type. I quadrati grigi e quelli neri indicano rispettivamente un aumento o una riduzione maggiore del 50%. In alto, alcuni immunoblot di CYP2E1 wild-type e mutato dopo immunoprecipitazione con alcuni sieri. In basso, alcune bande relative alla reattività, in western blotting, di due sieri lineari verso il CYP2E1 WT e le isoforme mutate.

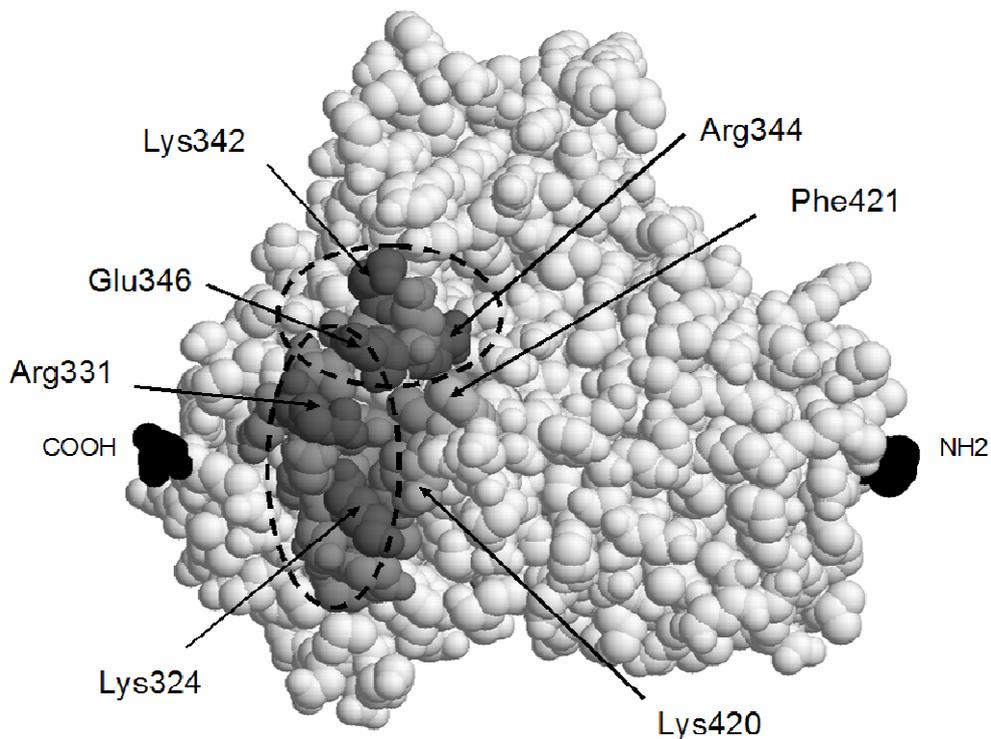


Figura 2: Modello molecolare tridimensionale di CYP2E1 (modalità spacefill). In nero sono colorate rispettivamente le estremità N- e C-terminale. Al centro, tra le eliche J', K'' e L in grigio scuro, è possibile osservare l'epitopo candidato con i residui aminoacidici Lys-324, Arg-331, Lys-342, Arg-344, Glu-346 e Lys-420 e Phe-421 (grigio chiaro) interessati dal processo di mutagenesi.

È stato recentemente riportato che la porzione N-terminale di CYP2E1 ed in particolare l'elica B con caratteristiche anfipatiche, è responsabile dell'interazione elettrostatica con i fosfolipidi carichi negativamente che ancorano il CYP2E1 alla membrana cellulare (41)

In particolare, la simulazione al computer dell'orientamento del CYP2E1 in relazione alla membrana mostra che l'epitopo da noi identificato risulta essere ben accessibile al legame degli anticorpi anti-CYP2E1 (Figura 3).

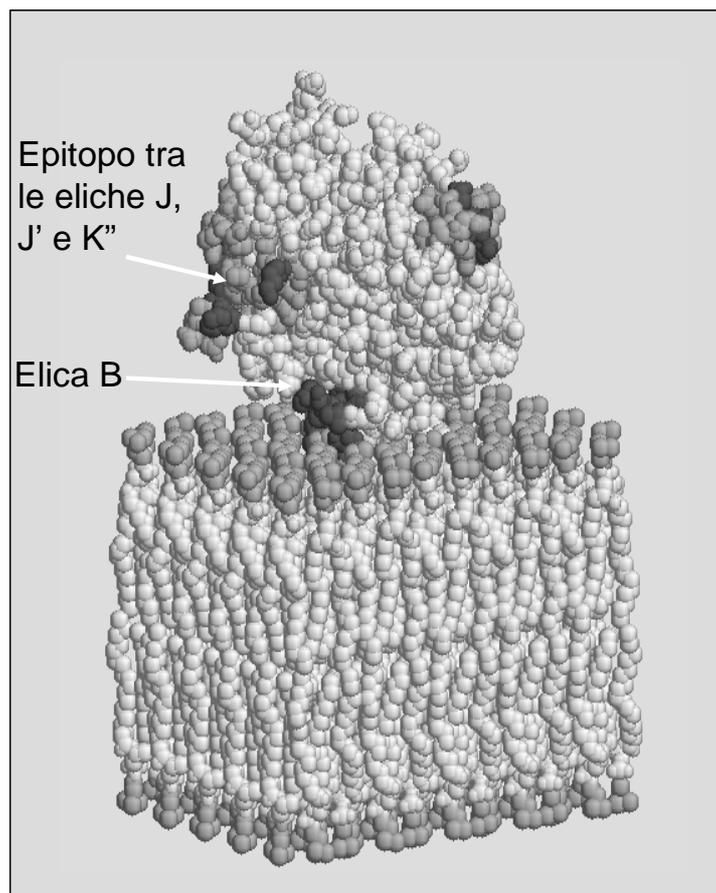


Figura 3: Modello molecolare tridimensionale relativo all'orientamento del CYP2E1 sulla membrana plasmatica (modalità spacefill). Nella parte bassa della figura possiamo osservare la rappresentazione tridimensionale del doppio strato fosfolipidico. Mentre, nella porzione superiore, in nero e grigio scuro, sono rappresentati i residui aminoacidici che costituiscono l'epitopo conformazionale da noi identificato e localizzato tra le eliche J, J' e K". In nero, sono anche indicati i residui aminoacidici che costituiscono l'elica B, la quale media l'ancoraggio del CYP2E1 al doppio strato fosfolipidico della membrana.

Tali osservazioni ci hanno spinto a valutare se effettivamente i sieri dei pazienti HCV fossero in grado di riconoscere il CYP2E1 espresso sulla membrana plasmatica. A tal fine è stata indotta, tramite la somministrazione, per due giorni consecutivi, di un bolo di acetone 30% (v/v) in fisiologica, l'espressione del CYP2E1 in ratti maschi di ceppo Wistar. Successivamente, i ratti sono stati sacrificati e gli epatociti sono stati isolati dal fegato, mediante perfusione con collagenasi, ed incubati con sieri di pazienti HCV. Dopodiché, sono stati analizzati in citofluorimetria a flusso per valutare l'effettiva reattività dei sieri umani verso il CYP2E1 di membrana. Da questi esperimenti emerge che i sieri dei pazienti HCV con IgG dirette verso il CYP2E1 sono in grado di marcare la superficie degli epatociti in maniera paragonabili ad un siero policlonale anti-CYP2E1 (36% vs 32% di eventi positivi), (Figura 4). Mentre, i sieri negativi per gli autoanticorpi anti-CYP2E1

mostrano una ridotta percentuale di positività se confrontati, rispettivamente, con il siero di controllo ed i sieri con IgG anti-CYP2E1 (dati non mostrati).

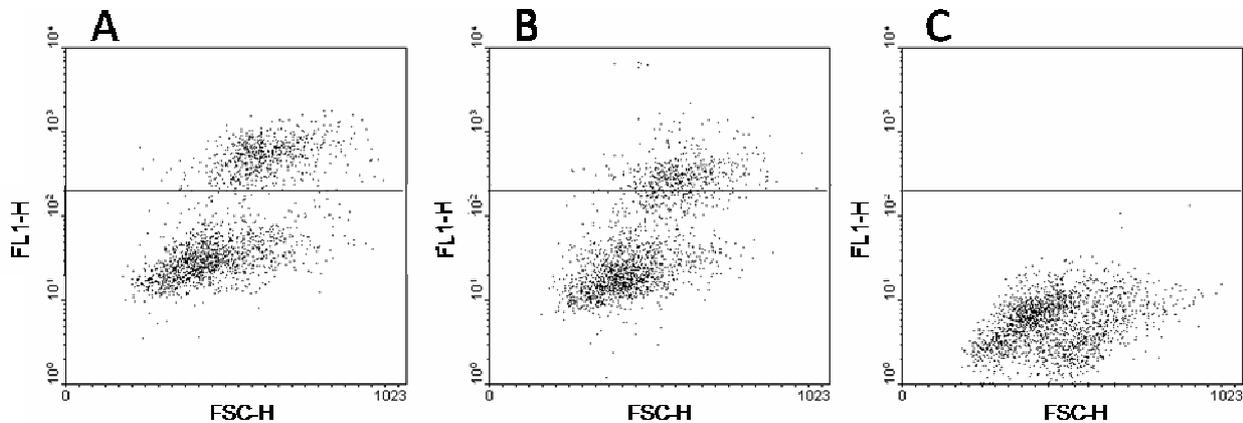


Figura 4. A) Dot plot relativo alla reattività, in citofluorimetria a flusso, di un siero HCV con IgG anti-CYP2E1 verso epatociti isolati da ratto e non permeabilizzati. B) Reattività verso gli epatociti di un siero policlonale di controllo anti-CYP2E1. C) Controllo negativo epatociti incubati con il solo anticorpo secondario fluorescinato.

Queste osservazioni suggeriscono che il CYP2E1 espresso in membrana è accessibile al riconoscimento da parte delle immunoglobuline; ciò ben si accorda con gli studi presenti in letteratura (7,15) e permette di confermare dati ottenuti precedentemente in immunofluorescenza, in cui la microscopia confocale ha confermato che gli anti-CYP2E1 legano il CYP2E1 presente sulla porzione esterna della membrana plasmatica degli epatociti, dove potrebbero mediare danno cellulare attraverso l'attivazione del complemento o con un meccanismo di citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente (ADCC).

Al momento, sono in corso degli studi volti alla comprensione di quali siano i meccanismi molecolari che fanno sì che la presenza di autoanticorpi, anti-CYP2E1 conformazionali, sia associata ad un danno epatico maggiore. In particolare, stiamo valutando se questi autoanticorpi riconoscano il CYP2E1 in membrana con una maggior affinità rispetto a quelli diretti verso antigeni lineari.

Studio dei meccanismi potenzialmente responsabili della perdita della tolleranza al self verso CYP2E1 nei pazienti con infezione cronica C.

Stante che gli autoanticorpi anti-CYP2E1 appaiono coinvolti nella patogenesi e nella progressione del danno epatico, la comprensione dei meccanismi responsabili della perdita della tolleranza al self verso il CYP2E1 risulta di fondamentale importanza. Studiando gli anticorpi anti-LKM-1 associati all'epatite C, diversi gruppi hanno riportato omologie di sequenza e cross-reattività fra CYP2D6 e diverse proteine di HCV, cytomegalovirus (10) e dell'herpes virus-1 (9). Sebbene, come abbiamo recentemente dimostrato, gli autoanticorpi anti-CYP2E1 non cross-reagiscano con il CYP2D6 (14), la forte omologia (40%) di sequenza tra i due citocromi suggerisce la possibilità che lo stesso meccanismo di mimetismo molecolare responsabile dello sviluppo degli anticorpi anti-LKM-1 possa anche promuovere l'autoreattività anti-CYP2E1. Per verificare tale possibilità, la sequenza aminoacidica CYP2E1₃₂₄₋₃₄₆ che concorre alla formazione dell'epitopo conformazionale del citocromo P4502E1 è stata allineata con la sequenza della poliproteina di alcuni genotipi di HCV scelti casualmente. I nostri risultati hanno messo in luce come esista una buona omologia di sequenza tra il peptide 324-346 di CYP2E1 ed i peptidi 421-480 di NS5B di vari genotipi di HCV ad eccezione del 4a (Figura 5).

CYP2E1 324-346 NS5B 1a 421-480	-----KLHEEID-RVIG-----PSRIPAIKDRQE----- ARMILMTHFFSVLIARDQLEQALDCEIYGACYSIEPLDLPPIIQRLHGLSAFSLHSYSPG	21
CYP2E1 324-346 NS5B 1b 421-480	-----KLHEEID-RVIG-----PSRIPAIKDRQE----- ARMILMTHFFSILLAQEQLEKALDCQIYGACYSIEPLDLPQIIRLHGLSAFSLHSYSPG	21
CYP2E1 324-346 NS5B 2a 421-480	-----KLHEEID-RVIG-----PSRIPAIKDRQE----- ARMVLMTHFFSILMAQDTLDQNLNFEMYGAVYSVSPLDLPAIIRLHGLDAFSLHTYTPH	21
CYP2E1 324-346 NS5B 2b 421-480	-----KLHEEID-RVIG-----PSRIPAIKDRQE----- VRMVIMTHFFSILLAQDTLNQNLNFEMYGAVYSVSNPLDLPAIIRLHGLDAFSLHTYSPH	21
CYP2E1 324-346 NS5B 2c 421-480	-----KLHEEID-RVIG-----PSRIPAIKDRQE----- VRMVLMTTHFFSVLMAQDTLDQDLNFEMYGAVYSVSPLDLPAIIRLHGLEAFSLHSYSPH	21
CYP2E1 324-346 NS5B 3a 421-480	-----KLHEEIDR-----VIG-----PSRIPAIKDRQE----- VRMVMTHFFSILQSCEILDRLDFEMYGATYSVTPLDLPAIIRLHGLSAFTLHSYSPV	21
CYP2E1 324-346 NS5B 4a 450-510	-----KLH-----EIDRVIGPSR---IPAIKDRQE----- VTYSITPLDLPAIIQRLHGLSAFTLHGYSPELNRVAGALRKLGVPLRAWRHRARAVRAK	26

Figura 5: Rappresentazione grafica dell'allineamento tra il peptide 324-346 di CYP2E1 umano e il peptide 421-480 di NS5B. In colore sono indicati rispettivamente i residui aminoacidi omologhi (nero) o quelli con simili caratteristiche chimico-fisiche (grigio).

Poiché la proteina NS5B del genotipo 1b di HCV è stata cristallizzata, ed è quindi disponibile il modello molecolare, abbiamo analizzato, tramite una simulazione al computer, la possibile analogia strutturale fra la zona 324-346 di CYP2E1 e quella 421-480 di NS5B di HCV 1b. La figura 6

mostra, in particolare, che gli aminoacidi Leu-325, Asp-330, Gly-334, Pro-335 e Pro-339 di CYP2E1 e gli omologhi virali Leu-439, Asp-444, Gly-449, Pro456 e Pro-460 sono localizzati rispettivamente in un' α -elica e in una porzione adiacente non strutturata. Allo stesso modo, gli aminoacidi Ile-341 e Arg-344 di CYP2E1 e Ile-462 e Arg-465 di NS5B si ritrovano in un'altra sequenza di α -elica (Figura 6). Infine, la conformazione tridimensionale dei due frammenti molecolari dimostra una disposizione spaziale abbastanza simile (RMSE = 0,062 nm) e comunque compatibile con l'ipotesi di cross-reattività dei due epitopi conformazionali. Queste osservazioni supportano la possibilità che fenomeni di mimetismo molecolare siano alla base dello sviluppo di reazioni autoimmuni verso CYP2E1 in corso di epatite cronica C.

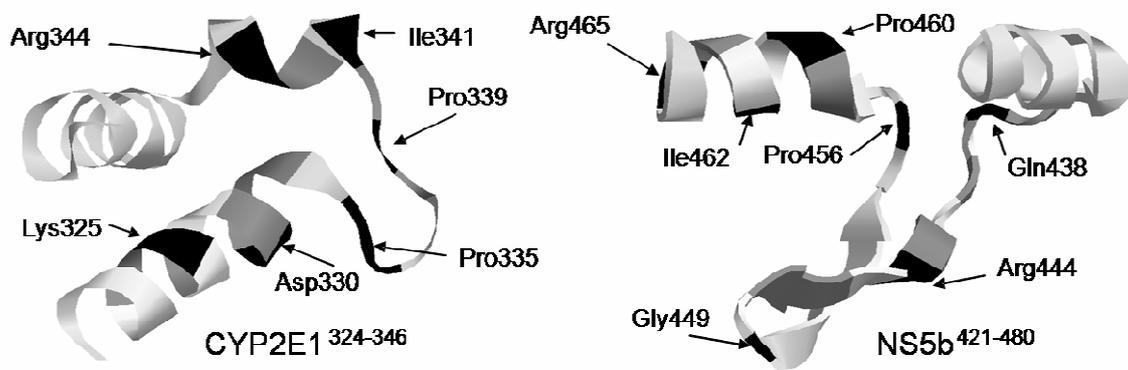


Figura 6: modelli molecolari dei peptidi selezionati di CYP2E1 umano e NS5B di HCV (genotipo 1b). In nero sono indicati rispettivamente i residui aminoacidici omologhi o quelli con simili caratteristiche chimico-fisiche.

Al fine di confermare questo meccanismo di perdita della tolleranza al self verso CYP2E1 nell'infezione cronica C abbiamo iniziato esperimenti di clonaggio del peptide virale omologo all'epitopo conformazionale riconosciuto dagli autoanticorpi.

I peptidi virali NS5B₄₂₂₋₄₈₀ dei genotipi 1b e 3a sono stati clonati nel vettore di espressione pGex4-T1 ed espressi, in cellule batteriche DH5 α , come proteine di fusione con il GST. Una volta purificate le proteine sono state utilizzate in saggi immuno-enzimatici, al fine di valutare la cross-reattività degli anticorpi anti-CYP2E1 con il peptide omologo virale.

Tuttavia, dagli esperimenti condotti è risultato che queste proteine ricombinanti non sono riconosciute, da parte di sieri HCV positivi per gli autoanticorpi anti-CYP2E1 conformazionali, ne in ELISA ne tanto meno in esperimenti di immunoprecipitazione.

Questo mancato riconoscimento è verosimilmente imputabile al fatto che il peptide possa assumere una conformazione tridimensionale che in qualche modo pregiudichi il riconoscimento da parte delle IgG anti-CYP2E1 conformazionali.

Oltre a queste considerazioni, è importante sottolineare che le due proteine sono dotate di una scarsa solubilità e ciò rende problematico il processo di purificazione. Tanto è vero che, la resa di questo step è decisamente molto scarsa ed è necessario recuperare buona parte di queste proteine dai corpi di inclusione delle cellule batteriche.

Per ovviare a questi inconvenienti, abbiamo deciso di condurre una ulteriore analisi degli allineamenti di sequenza (Figura 5), che ci ha permesso di mettere in evidenza come l'omologia di sequenza tra i peptidi CYP2E1₃₂₄₋₃₃₄ e CYP2E1₃₃₅₋₃₄₆ e, rispettivamente, i peptidi di HCV NS5B₄₃₈₋₄₄₉ e NS5B₄₅₆₋₄₆₅ sia nettamente superiore a quella riscontrata per l'intero peptide CYP2E1₃₂₄₋₃₄₆. In particolare, tale omologia risulta essere ben conservata tra i differenti genotipi di HCV ad eccezione del 4a (Figura 5); questo ben si accorda con i risultati precedentemente ottenuti circa la mancanza di una associazione tra il genotipo virale e la presenza degli autoanticorpi anti-CYP2E1.

Le sequenze codificanti NS5B₄₃₈₋₄₄₉ e NS5B₄₅₆₋₄₆₅ sono state quindi clonate nel vettore pGex4T-1 ed espresse, in cellule batteriche (DH5 α), come proteine di fusione con il GST. Saggi in ELISA, utilizzando come antigeni le proteine GST-NS5B₄₃₈₋₄₄₉ e GST-NS5B₄₅₆₋₄₆₅ purificate, hanno evidenziato come i sieri che riconoscono prevalentemente epitopi conformazionali legano più efficientemente i peptidi virali rispetto ai sieri lineari o negativi per gli anti-CYP2E1. Inoltre, è possibile osservare come sieri negativi per autoanticorpi anti-CYP2E1 abbiano una reattività paragonabile a quella di sieri di soggetti sani, usati come controlli, avvalorando l'ipotesi della cross-reattività tra IgG anti-CYP2E1 conformazionali e specifiche strutture della poliproteina di HCV (Figura 7).

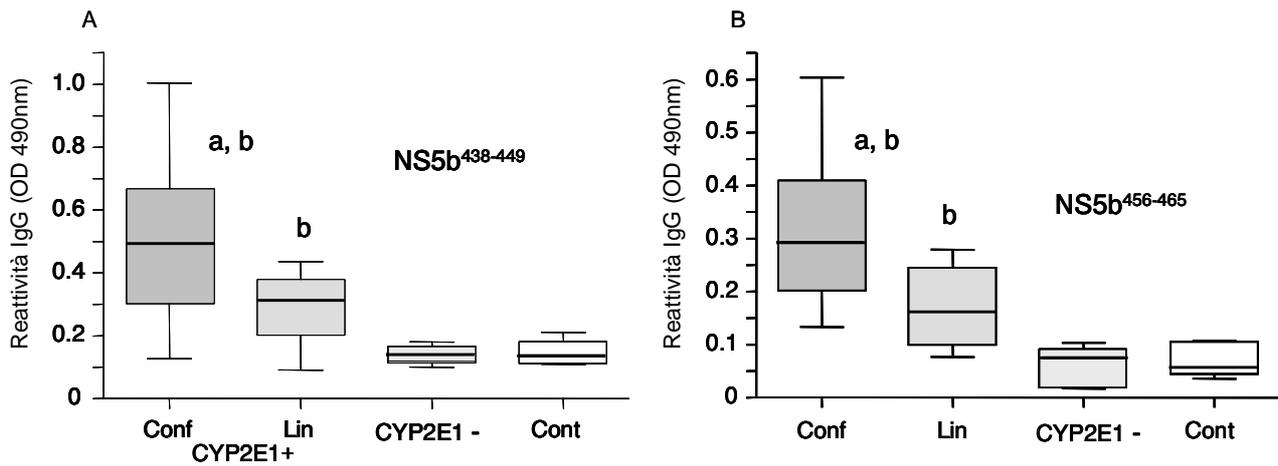


Figura 7: (Pannelli A, B) Valutazione, mediante saggio ELISA, della capacità di riconoscimento delle proteine GST-NS5B₄₃₈₋₄₄₉ e GST-NS5B₄₅₆₋₄₆₅ da parte di 20 sieri HCV con IgG dirette, rispettivamente, verso epitopi conformazionali (CYP2E1+Conf) o lineari (CYP2E1+Lin). Sono inoltre stati usati come controlli 5 sieri negativi per IgG anti-CYP2E1 e 5 sieri di soggetti sani. I valori sono espressi come unità di densità ottica a 490nm. Le scatole comprendono i valori tra il 25° e il 75° percentile, le linee in neretto rappresentano le mediane, le linee al di fuori delle scatole si estendono dal 10° al 90° percentile (80% dei valori). Significatività statistica: a) $p < 0.05$ vs sieri con IgG anti-CYP2E1 lineari; b) $p < 0.001$ vs controlli o sieri negativi per anti-CYP2E1.

Successivi esperimenti di competizione hanno mostrato che entrambe le proteine, GST-NS5B₄₃₈₋₄₄₉ e GST-NS5B₄₅₆₋₄₆₅ se pre-incubate con i sieri dei pazienti sono più efficienti, rispetto al solo GST, nel determinare una riduzione del riconoscimento del CYP2E1 da parte degli autoanticorpi conformazionali (Figura 8). Mentre non alterano, significativamente, l'affinità degli anticorpi diretti verso gli epitopi lineari del CYP2E1 (dati non mostrati). Nello specifico, con questo esperimento abbiamo escluso che il legame delle IgG alle proteine ricombinanti, osservato in ELISA (Figura 7), fosse in realtà mediato dal riconoscimento della proteina carrier.

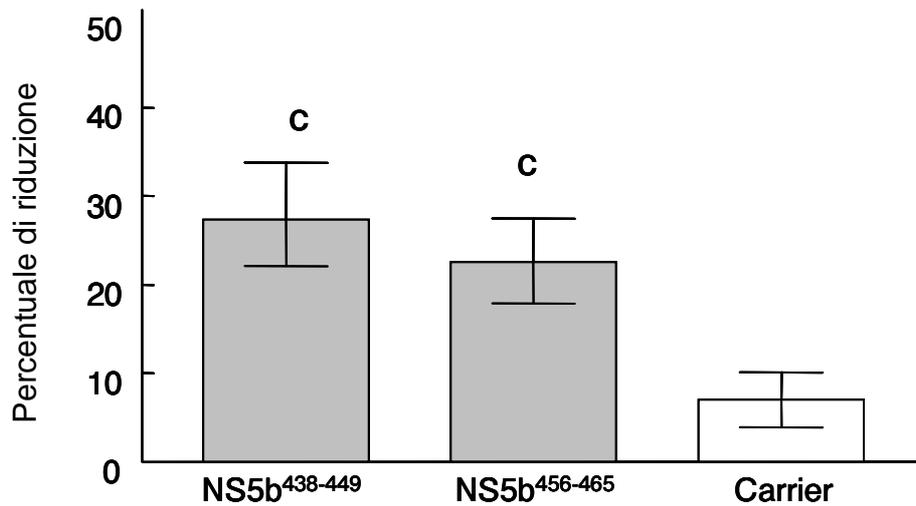


Figura 8: Valutazione della capacità delle proteine di fusione GST-NS5B₄₃₈₋₄₄₉ e GST-NS5B₄₅₆₋₄₆₅ o del solo GST di ridurre il riconoscimento del CYP2E1 da parte di 5 sieri HCV, con IgG dirette verso antigeni conformazionali del CYP2E1. I valori sono espressi come percentuale della reattività basale dei sieri verso il CYP2E1. Significatività statistica: c) $p < 0.05$ vs i sieri pre-adsorbiti con la sola proteina carrier GST.

Complessivamente, questi risultati sostengono la possibilità che il mimetismo molecolare, con le proteine di HCV, possa condurre allo sviluppo di auto-reattività anti-CYP2E1 nel corso dell'infezione cronica C.

DISCUSSIONE

Gli autoanticorpi anti-CYP2E1 sono stati inizialmente ritrovati in associazione con l'epatite indotta da alotano (15), con il danno epatico causato da refrigeranti idroclorofluorocarburi (HCFC) (23) e nell'epatite idiosincrasica indotta da anestetici (24). Inoltre gli stessi autoanticorpi sono presenti in un sottogruppo (circa il 35-40%) di pazienti con epatite e/o cirrosi alcolica (16). Sia gli autoanticorpi anti-CYP2E1 indotti dall'alotano sia quelli indotti dall'alcol riconoscono specificatamente due epitopi conformazionali sulla superficie della molecola di CYP2E1 che corrispondono, rispettivamente, all'elica G e ad un'area formata dalla giustapposizione delle eliche J' e K'' nella porzione C-terminale della molecola (17). La presenza nel siero dei pazienti con CHC di anticorpi diretti prevalentemente verso epitopi conformazionali di CYP2E1, identificati tramite esperimenti di immunoprecipitazione e western blotting, unitamente alla capacità dei sieri di riconoscere CYP2E1 esposto sulla superficie di epatociti (14), ci ha indotto a caratterizzare i possibili epitopi coinvolti.

Isoforme di CYP2E1 correttamente avvolte e recanti singole sostituzioni aminoacidiche nella porzione C-terminale, ci hanno permesso di studiare il ruolo di alcune delle regioni da noi selezionate per la reattività anti-CYP2E1 dei pazienti CHC. I nostri dati, ottenuti analizzando 20 pazienti CHC, hanno evidenziato che, nonostante l'ampia variabilità presentata nel riconoscimento delle isoforme mutate, uno degli epitopi conformazionali coinvolto nel legame degli anti-CYP2E1 è localizzato a livello delle eliche J, J' e K''. È interessante notare che questo epitopo mappa nella stessa area di uno dei due epitopi maggiori caratterizzati nei pazienti con epatopatia alcolica ed epatite da alotano (17). Tuttavia l'epitopo da noi identificato sembra coinvolgere una zona più vasta rispetto a quello coinvolto nella malattia epatica alcolica. Inoltre, contrariamente a quanto osservato nella patologia epatica alcolica e nell'epatite da alotano, l'elica G non sembra essere un sito antigenico nei pazienti con infezione cronica C. Questi risultati sono in accordo con la mancata associazione tra alcol e reattività anti-CYP2E1 e avvalorerebbero l'ipotesi di un diverso meccanismo di perdita della tolleranza al self nei pazienti CHC rispetto ai pazienti alcolisti. Inoltre, il fatto che l'epitopo da noi identificato sia localizzato in un'area completamente differente da quella interessata dal legame degli autoanticorpi anti-CYP2D6, potrebbe spiegare l'assenza di cross-reattività CYP2E1-CYP2D6 dei sieri CHC.

Inoltre, è stato dimostrato che la porzione N-terminale di CYP2E1 ed in particolare l'elica B con caratteristiche anfipatiche, è responsabile dell'interazione elettrostatica con i fosfolipidi carichi negativamente che ancorano il CYP2E1 alla membrana cellulare (41). La simulazione al computer dell'orientamento del CYP2E1 in relazione alla membrana (17) mostra che l'epitopo da noi

identificato, localizzato nella regione compresa tra le eliche J, J' e K'', risulta essere ben accessibile al legame degli anticorpi. In effetti, esperimenti in citofluorimetria a flusso hanno dimostrato che il CYP2E1 espresso sulla membrana degli epatociti è riconosciuto sia da un siero policlonale anti-CYP2E1, prodotto in coniglio, sia dai sieri dei pazienti con CHC. Questo dato ben si accorda con studi presenti in letteratura (7, 15) e con quanto osservato da noi precedentemente in esperimenti di immunofluorescenza, in cui la microscopia confocale ha messo in evidenza che gli anti-CYP2E1 legano il CYP2E1 presente sulla porzione esterna della membrana plasmatica degli epatociti, dove potrebbero mediare danno cellulare attraverso l'attivazione del complemento o con un meccanismo di citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente (ADCC). L'identificazione di un epitopo conformazionale, sulla superficie molecolare del CYP2E1, che dalla simulazione al computer risulta essere accessibile al legame da parte delle IgG anti-CYP2E1, unitamente ai dati ottenuti in citofluorimetria a flusso ed in immunofluorescenza ci hanno indotto a valutare i possibili meccanismi coinvolti nella perdita della tolleranza al self verso il CYP2E1.

Al momento i meccanismi molecolari alla base dello sviluppo di autoimmunità in corso di epatite cronica C sono ancora largamente sconosciuti. Kerkar e colleghi hanno identificato una stretta omologia di sequenza e cross-reattività tra l'epitopo 193-212 di CYP2D6, riconosciuto da circa il 50% dei sieri con epatite cronica C positivi per gli anticorpi anti-LKM-1, e due strutture virali, la RNA-polimerasi RNA-dipendente dell'HCV (NS5; HCV 2977-2996) e l'esonucleasi alcalina del cytomegalovirus (CMV 121-140) (10). Inoltre, ulteriori omologie di sequenza sono state riportate tra l'epitopo 254-271 di CYP2D6 e le proteine dell'HCV e dell'herpes virus-1 (HSV-1) (9), suggerendo che il mimetismo molecolare con antigeni virali possa essere responsabile dello sviluppo dell'autoreattività anti-CYP2D6. A questo proposito, Marceau e collaboratori hanno recentemente dimostrato che i sieri di pazienti con epatite cronica C, positivi per gli anticorpi anti-LKM-1, che riconoscono l'epitopo conformazionale 254-288 di CYP2D6 cross-reagiscono con le proteine NS3 e NS5 del virus HCV (11). In accordo con questi dati, le omologie di sequenza e struttura riscontrate fra l'epitopo 324-346 di CYP2E1 e la porzione 421-480 della proteina NS5B di HCV suggeriscono che fenomeni di mimetismo molecolare siano anche alla base dello sviluppo dell'autoreattività anti-CYP2E1. In particolare, la sequenza CYP2E1₃₂₄₋₃₄₆ contenente l'epitopo conformazionale, riconosciuto dagli anticorpi anti-CYP2E1 associati alla CHC, mostra una buona omologia di sequenza con due peptidi (438-449aa e 456-465aa) che risultano essere ben conservati nella sequenza della RNA polimerasi RNA-dipendente (NS5B) di molti genotipi di HCV. Inoltre, è emerso che le proteine ricombinanti GST-NS5B₄₃₈₋₄₄₉ e GST-NS5B₄₅₆₋₄₆₅ sono preferenzialmente riconosciute dai sieri con IgG dirette verso epitopi conformazionali, in effetti, i due peptidi competono con il CYP2E1 per il legame con questi anticorpi. Il fatto che, due peptidi distinti, siano

riconosciuti dagli anticorpi conformazionali anti-CYP2E1 suggerisce che l'area antigenica CYP2E1₃₂₄₋₃₄₆ contiene almeno due epitopi diversi che determinano l'insorgenza di una risposta anticorpale policlonale (Figura 5). Inoltre, la stretta vicinanza di questi epitopi con il loop presente tra le eliche K' ed L può spiegare il motivo tale per cui le mutazioni a carico di Lys420 e Phe421 (Figura 5) possano interferire con il riconoscimento del CYP2E1 da parte di alcuni sieri CHC. Sorprendentemente, i sieri CHC riconoscono, con una buona affinità, il peptide NS5B₄₃₈₋₄₄₉ che, tra i due, è quello con la minore similarità strutturale con la propria sequenza omologa sul CYP2E1 (Figura 6). Questo suggerisce la possibilità che quando NS5B₄₃₈₋₄₄₉ non è racchiuso, all'interno della propria molecola, possa acquisire una conformazione ad α -elica simile a quella del peptide CYP2E1₃₂₄₋₃₃₄. Quindi, fenomeni di mimetismo molecolare con NS5B, a livello delle cellule B, potrebbero spiegare la perdita della tolleranza al self verso specifiche strutture conformazionali del CYP2E1. In particolare, deve essere ricordato che la cross-reattività tra la sequenza CYP2D6₂₄₅₋₂₈₈ e NS3 e NS5a è già stata proposta per spiegare l'origine degli anticorpi anti-LKM1 associati alla CHC (11).

In conclusione, i nostri risultati dimostrano che, in un sottogruppo di pazienti con infezione cronica C, fenomeni di mimetismo molecolare stimolati da NS5B possono portare allo sviluppo di autoimmunità verso epitopi conformazionali presenti nel CYP2E1. Inoltre, abbiamo dimostrato che la presenza di autoanticorpi anti-CYP2E1 diretti verso epitopi conformazionali, nei pazienti con una persistente infezione C, costituisce un fattore di rischio per una più severa necro-infiammazione, suggerendo il loro possibile impiego per lo screening di soggetti con un più alto rischio di progressione della malattia epatica.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Strassburg C.P., Vogel A., Manns M.P. (2003) *Autoimmun. Rev.* **2**, 322-331
- 2) Bogdanos D.P., Mieli-Vergani G., Vergani D. (2005) *Clin. Infect. Dis.* **40**, 508-510
- 3) Rigamonti C., Vidali M., Donato M.F., Sutti S., Occhino G., Ivaldi A., Arosio E., Agnelli F., Rossi G., Colombo M., Albano E. (2009) *Am J. Transplant.* **9(3)**, 601-9
- 4) Strassburg C.P., Manns M.P. (2002) *Semin. Liver. Dis.* **22**, 339-352
- 5) Giostra F., Manzin A., Lenzi M., Francesconi R., Solforosi L., Manotti P., Muratori L., Zauli D., Clementi M., Bianchi F.B. (1996) *J. Hepatol.* **25**, 433-438
- 6) Vergani D. (2000) *Gut* **46**, 449-450
- 7) Muratori L., Parola M., Ripalti A., Robino G., Muratori P., Bellomo G., Carini R., Lenzi M., Landini M.P., Albano E., Bianchi F.B. (2000) *Gut* **46**, 553-561
- 8) Ma Y., Thomas M.G., Okamoto M., Bogdanos D.P., Nagl S., Kerkar N., Lopes A.R., Muratori L., Lenzi M., Bianchi F.B., Mieli-Vergani G., Vergani D. (2002) *J. Immunol.* **169**, 277-285
- 9) Manns M.P., Griffin K.J., Sullivan K.F., Johnson E.F. (1991) *J. Clin. Invest.* **88**, 1370-1378
- 10) Kerkar N., Choudhuri K., Ma Y., Mahmoud A., Bogdanos D.P., Muratori L., Bianchi F., Williams R., Mieli-Vergani G., Vergani D. (2003) *J. Immunol.* **170**, 1481-1489
- 11) Marceau G., Lapierre P., Beland K., Soudeyns H., Alvarez F. (2005) *Hepatology* **42**, 675-682
- 12) Dalekos G.N., Obermayer-Straub P., Bartels M., Maeda T., Kayser A., Braun S., Loges S., Schmidt E., Gershwin M.E., Manns M.P. (2003) *J. Hepatol.* **39**, 800-806
- 13) Miyakawa H., Kitazawa E., Kikuchi K., Fujikawa H., Kawaguchi N., Abe K., Matsushita M., Matsushima H., Igarashi T., Hankins R.W., Kako M. (2000) *Autoimmunity* **33**, 23-32
- 14) Vidali M., Occhino G., Ivaldi A., Serino R., Moia S., Alchera E., Carini R., Rigamonti C., Sartori M., Albano E. (2007) *J Hepatol.* **46**, 605-612
- 15) Bourdi M., Chen W., Peter R.M., Martin J.L., Buters J.T., Nelson S.D., Pohl L.R. (1996) *Chem. Res. Toxicol.* **9**, 1159-1166
- 16) Vidali M., Stewart S.F., Rolla R., Daly A.K., Chen Y., Mottaran E., Jones D.E., Leathart J.B., Day C.P., Albano E. (2003) *Hepatology* **37**, 410-419
- 17) Vidali M., Hidestrand M., Eliasson E., Mottaran E., Reale E., Rolla R., Occhino G., Albano E., Ingelman-Sundberg M. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 50949-50955
- 18) Corrao G., Aricò S., Russo R., Carle F., Galatola G., Torchio P.F., Moiraghi A.R., di Orio F., de la Pierre M. (1991) *Int. J. Epidemiol.* **20**, 1037-1042
- 19) Ishak K., Baptista A., Bianchi L., Callea F., De Groote J., Gudat F., Denk H., Desmet V., Korb G., MacSween R.N., Phillips M.J., Portmann B.G., Poulsen H., Scheuer P.J., Schmid M., Thaler H. (1995) *J. Hepatol.* **22**, 696-699

- 20) Barnes H.J. (1996) *Methods Enzymol.* **272**, 3-14
- 21) Gillam E.M., Guo Z., Guengerich F.P. (1994) *Arch. Biochem. Biophys.* **312**, 59-66
- 22) Omura T., Sato R. (1964) *J. Biol. Chem.* **329**, 2370-2378
- 23) Hoet P., Graf M.L., Bourdi M., Pohl L.R., Duray P.H., Chen W., Peter R.M., Nelson S.D., Verlinden N., Lison D. (1997) *Lancet* **350**, 556-559
- 24) Njoku D.B., Mellerson J.L., Talor M.V., Kerr D.R., Faraday N.R., Outschoorn I., Rose N.R. (2006) *Clin. Vaccine Immunol.* **13**, 25-524
- 25) Van Pelt F.N., Straub P., Manns MP. (1995) *Semin Liver Dis.* **15**, 283-300
- 26) Yamamoto A.M., Cresteil D., Homberg J.C., Alvarez F. (1993) *Gastroenterology* **104**, 1762-1767
- 27) Duclos-Vallee J.C., Hajoui O., Yamamoto A.M., Jacz-Aigrain E., Alvarez F. (1995) *Gastroenterology* **108**, 470-476
- 28) Lohr H.F., Schlaak J.F., Lohse A.W., Bocher W.O., Arenz M., Gerken G., Meyer Zum Buschenfelde K.H. (1996) *Hepatology* **24**, 1416-1421
- 29) Arenz M., Pingel S., Schirmacher P., Meyer zum Buschenfelde K.H., Lohr H.F. (2001) *Liver* **21**, 18-25
- 30) Liangpunsakul S., Kolwankar D., Pinto A., Gorski J.C., Hall S.D., Chalasani N. (2005) *Hepatology* **41**, 1144-1150
- 31) Oneta C.M., Lieber C.S., Li J., Ruttimann S., Schmid B., Lattmann J., Rosman A.S., Seitz H.K. (2002) *J Hepatol.* **36**, 47-52
- 32) Dupont I., Lucas D., Clot P., Menez C., Albano E. (1998) *J Hepatol* **28**, 564-571
- 33) Lonardo A., Adinolfi L.E., Loria P., Carulli N., Ruggiero G., Day C.P. (2004) *Gastroenterology* **126**, 586-597
- 34) Emery M.G., Fisher J.M., Chien J.Y., Kharasch E.D., Dellinger E.P., Kowdley K.V., Thummel K.E. (2003) *Hepatology* **38**, 428-435
- 35) Chalasani N., Gorski J.C., Asghar M.S., Asghar A., Foresman B., Hall S.D., Crabb D.W. (2003) *Hepatology* **37**, 544-550
- 36) Belloc C., Gauffre A., André C., Bearne P.H. (1997) *Pharmacogenetics* **7**, 181-186
- 37) Lecoeur S., André C., Beaune P.H. (1996) *Mol Pharmacol.* **50**, 326-333
- 38) Leeder J.S., Gaedigk A., Lu X., Cook V.A. (1996) *Mol. Pharmacol.* **49**, 234-243
- 39) Lytton S.D., Helander A., Zhang-Gouillon Z., Stokkeland K., Bordone R., Aricò S., Albano E., French S.W., Ingelman-Sundberg M. (1999) *Mol. Pharmacol.* **55**, 223-233

- 40) Wedlock N., Asawa T., Baumann-Antczak A., Rees Smith B., Furmaniak J. (1993) *FEBS* **332**, 123-126
- 41) Neve E.P.A., Hidestrand M., Ingelman-Sundberg M. (2003) *Biochemistry* **42**, 14566-14575

ATTIVITÀ FORMATIVA ANNO ACCADEMICO 2008-2009

- 5 dicembre 2008, ***Production of bio-farmaceuticals in plants***, Prof. Luca Santi, Virologia e Biotecnologie Vegetali, Dipartimento di Biologia, Facoltà di Scienze Università degli Studi di Roma "Tor Vergata".
- 12 dicembre 2008 , ***Le cellule Mesenchimali Staminali per il trattamento delle malattie neurologiche***, Antonio Uccelli, Università degli Studi di Genova.
- 15 dicembre 2008, ***Interazioni geni - ambiente nella eziologia della SM: studi sui gemelli***, **Marco Salvetti**, Università "La Sapienza" di Roma.
- 9 gennaio 2009, ***La malattia celiaca***, Riccardo Troncone, Università "Federico II" di Napoli
- 13 gennaio 2009, ***Porpora trombocitopenica autoimmune:nuovi orientamenti fisiopatologici e terapeutici***, Francesco Zaja, Università di Udine
- 27 gennaio 2009, ***Interazioni geni - ambiente nella eziologia della sclerosi multipla: studi sui gemelli***, Marco Salvetti, Università "La Sapienza" di Roma
- 10 febbraio 2009, ***Non solo motoneuroni: il contributo del muscolo scheletrico alla patogenesi della sclerosi laterale amiotrofica***, Antonio Musarò, Dipartimento di Istologia e Embriologia, Università "La Sapienza" di Roma
- 20 febbraio 2009, ***When a fine tuner of signaling pathways becomes a dangerous amplifier: the case of the Prolyl-isomerase Pin1 in cancer***, Giannino Del Sal, Università di Trieste, Laboratorio Nazionale CIB, Area Science Park, Padriciano, Trieste
- 26 febbraio 2009, ***Il metabolismo degli endocannabinoidi e la sua rilevanza terapeutica***, Mauro Maccarrone, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Teramo
- 18 marzo 2009, ***La proteomica: un nuovo modo di guardare al mondo delle proteine***, Piero Pucci, Dipartimento di Biochimica Clinica e Organica, Università di Napoli Federico II
- 18 marzo 2009, ***Cellule staminali tumorali: implicazioni terapeutiche***, Giorgio Stassi Dipartimento di Scienze Oncologiche e Chirurgiche, Università di Palermo
- 19 marzo 2009, ***Le nanotecnologie applicate alla medicina***, G. Peluso Istituto di Biochimica delle proteine, CNR di Napoli
- 23 marzo 2009, ***Enzima P e il Social Network per l'Innovazione***, Salvatore Timpanaro, Responsabile Scientifico del Social Network per l'Innovazione, Politecnico di Torino
- 23 marzo 2009, ***Tecnologie innovative in ergonomia, ginecologia, medicina del lavoro e dello sport***, Roberto Merletti, Responsabile del Laboratorio di Ingegneria del Sistema Neuromuscolare, Dipartimento di Elettronica del Politecnico di Torino
- 26 marzo 2009, ***Regulation of integrin functions in vascular systems***, Federico Bussolino, Department of Oncological Sciences, University of Torino

- 9 aprile 2009, *I bioreattori nella Medicina Rigenerativa: dalla ricerca alla realtà di una start-up*, Sara Mantero, Dipartimento di Bioingegneria, Politecnico di Milano
- 28 aprile 2009, *Polycystin-1, the product of the PKD1 gene mutated in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease (ADPKD), is an orphan receptor regulating cell migration and polarity*, Anna Boletta, P.I. at Dulbecco Telethon Institute, at DIBIT San Raffaele Scientific Institute, Milano
- 30 aprile 2009, *Polarized inflammation in tumour development*, Antonio Sica, Dipartimento di Scienze Chimiche, Alimentari, Farmaceutiche e Farmacologiche (DISCAF), Università del Piemonte Orientale
- 5 maggio 2009, *Effetti anti-steatogeni ed anti-tumorali degli agonisti del recettore dell'ormone tiroideo*, Amedeo Columbano, Dip. Tossicologia, Sezione Oncologia e Patologia Molecolare, Università di Cagliari
- 6 maggio 2009, *Integrated nanoparticle–biomolecule hybrid systems: design of stimuli-responsive nanomaterials for cancer diagnosis and therapy*, Barbara Palazzo, Department of Chemistry, University of Bologna.
- 12 maggio 2009, *Ipercolesterolemia e progressione di malattia in patologia umana*, Giuseppe Poli, Università di Torino (II Facoltà di Medicina e Chirurgia)
- 12 maggio 2009, *Neurotossicità delle proteine 'misfolded' nelle malattie del motoneurone*, Angelo Poletti, Università di Milano (Facoltà di Medicina e Chirurgia)
- 14 maggio 2009, *Tecniche di split liver nel trapianto di fegato adulto e pediatrico*, V. Corno, Divisione di Chirurgia Generale, Centro Trapianto di Fegato e Centro Trapianto di Polmone Ospedali Riuniti di Bergamo
- 14 maggio 2009, *Functional Genomics of Brain*, Stefano Gustincich, SISSA di Trieste Basovizza, Trieste ITALY
- 21 maggio 2009, *Il Doping ormonale: aspetti clinici e legislativi*, Prof. L. Di Luigi, Università agraria; Foro Italico di Roma
- 10 giugno 2009, *Marcatori molecolari nel carcinoma coloretale: dalla teoria alla pratica clinica*, Milo Frattini, Responsabile Laboratorio di Diagnostica Molecolare Istituto Cantonale di Patologia, Locarno (Svizzera)

PUBBLICAZIONI

Rigamonti C, Vidali M, Donato MF, **Sutti S**, Occhino G, Ivaldi A, Arosio E, Agnelli F, Rossi G, Colombo M, Albano E. Serum autoantibodies against cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) predict severity of necroinflammation of recurrent hepatitis C. *Am J Transplant* 9(3): 601-9, 2009.

Vidali M, Tripodi MF, Ivaldi A, Zampino R, Occhino G, Restivo L, **Sutti S**, Marrone A, Ruggiero G, Albano E, Adinolfi LE. Interplay between oxidative stress and hepatic steatosis in the progression of chronic hepatitis C. *J Hepatol* 48(3):399-406, 2008.

Vidali M, Hietala J, Occhino G, Ivaldi A, **Sutti S**, Niemelä O, Albano E. Immune responses against oxidative stress-derived antigens are associated with increased circulating tumor necrosis factor-alpha in heavy drinkers. *Free Radic Biol Med.* 45(3):306-11, 2008.

ABSTRACTS

Sutti S., Vidali M., Maina v., Bozzola C., Mombello C., Boldorini R., Albano E
Role of immune responses triggered by oxidative stress in the progression of nonalcoholic fatty liver disease. EASL European association for the study of the liver. Special Conference: NASH/NAFLD and Related Metabolic Disease. September 24-26, 2009. Bologna, Italy.

Vidali M., **Sutti S.**, Adinolfi L.E., Day C.P., Sartori M., Albano E.
Interplay between steatosis and oxidative stress in advanced liver damage: a comparative study in a large cohort of patients with ALD, NAFLD/NASH and CHC. EASL European association for the study of the liver. Special Conference: NASH/NAFLD and Related Metabolic Disease. September 24-26, 2009. Bologna, Italy.

E. Albano, M. Vidali, **S. Sutti**. New insights in the role of oxidative stress in the adverse effects of alcohol in the liver. Dept. of Medical Sciences, University "Amedeo Avogadro" of East Piedmont, Novara, Italy
Society For Free Radical Research-Europe Meeting 2009, Rome, August 26-29, 2009. Free Radical Research volume 43, Supplement 1 (August 2009).

Sutti S., Vidali M., Occhino G., Ivaldi A., Potettu E., Rigamonti C., Sartori M., Albano E. Auto-antibodies against cytochrome P4502E1 (CYP2E1) conformational epitopes are associated to a more advanced liver damage in patients with chronic hepatitis C. EASL European association for the study of the liver. Monothematic Conference: Immune Mediated Liver Injury. December 4-6, 2008. Hamburg, Germany.

Vidali M., Rigamonti C., Donato M.F., **Sutti S.**, Occhino G., Ivaldi A., Arosio E., Agnelli F., Rossi G., Colombo M., Albano E. Auto-antibodies against cytochrome P4502E1 (CYP2E1) contribute to the severity of necroinflammation in liver transplanted patients with recurrent hepatitis C. EASL European association for the study of the liver. Monothematic Conference: Immune Mediated Liver Injury. December 4-6, 2008. Hamburg, Germany.

Vidali M, **Sutti S**, Occhino G, Bozzola C, Boldorini R, Albano E. Immune responses triggered by oxidative stress in the progression of nonalcoholic fatty liver disease. 29° Congresso della Società Italiana di Patologia Cosenza Settembre 2008. Am J Pathol 173(suppl. 1) S10, 2008.

Sutti S, Vidali M, Occhino G, Ivaldi A, Potettu E, Serino R, Moia S, Rigamonti C, Sartori M, Albano E. Autoantibodies against cytochrome P4502E1 (CYP2E1) conformational antigens in patients with chronic hepatitis C. EASL European

association for the study of the liver. April 23-27, 2008 Milan, Italy. Journal of Hepatology 48(S2), 2008.

Vidali M, Hietala J, Occhino G, Ivaldi A, **Sutti S**, Niemela O, Albano E. Immune responses toward oxidative stress-derived antigens sustain inflammation in Alcoholic Liver Disease. EASL European association for the study of the liver. April 23-27, 2008 Milan, Italy. Journal of hepatology 48(S2), 2008.

Sutti S, Vidali M, Occhino G, Ivaldi A, Potettu E, Serino R, Moia S, Rigamonti C, Sartori M, Albano E. Clinical and molecular characterization of anti-CYP2E1 autoantibodies in patients with chronic hepatitis C. European Bioalpine Convention 6-7 November 2007 Colleretto Giacosa (TO) Italy.

Vidali M, **Sutti S**, Occhino G, Ivaldi A, Potettu E, Hietala J, Niemela O, Albano E. Immune responses toward oxidative stress-derived antigens sustain inflammation in Alcoholic Liver Disease. European Bioalpine Convention 6-7 November 2007 Colleretto Giacosa (TO) Italy.

Occhino G, Ivaldi A, Hietala J, **Sutti S**, Vidali M, Niemela O, Albano E. Immune responses induced by oxidative stress contribute to hepatic inflammation in Alcoholic Liver Disease. ESBRA 2007 11h Congress Of The European Society For Biomedical Research On Alcoholism - Berlin - Germany, 23-26 Settembre 2007. Alcohol and Alcoholism 42(S1):I43(OC8-2), 2007.

CONGRESSI FREQUENTATI

- EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER. Special Conference: NASH/NAFLD and Related Metabolic Disease. September 24-26, 2009. Bologna, Italy.

- EASL Basic School of Hepatology. Course 4: Liver Immunology. January 22-24, 2009. Lisbon, Portugal.
- EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER. Monothematic Conference: Immune Mediated Liver Injury. December 4-6, 2008. Hamburg, Germany.
- 43rd Annual Meeting of the EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER April 23-27, 2008 Milan, Italy.
- European Bioalpine Convention 6-7 November 2007 Colleretto Giacosa (TO) Italy.

CORSI FREQUENTATI

- Partecipazione a seminari sottoforma di Journal Club tenuti dai dottorandi su argomenti vari.